



## Mucosal vaccine using CTL epitope-pulsed dendritic cell confers protection for intracellular pathogen

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小澤, 雄一 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/804">http://hdl.handle.net/10271/804</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 542号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏名	小澤雄一		
論文題目	Mucosal vaccine using CTL epitope-pulsed dendritic cell confers protection for intracellular pathogen (細胞傷害性 T 細胞エピトープをパルスした樹状細胞を用いた粘膜ワクチンは細胞内寄生菌に対する防御能を付与する)		

博士(医学) 小澤 雄一

## 論文題目

Mucosal vaccine using CTL epitope-pulsed dendritic cell confers protection for intracellular pathogen

(細胞傷害性 T 細胞エピトープをパルスした樹状細胞を用いた粘膜ワクチンは細胞内寄生菌に対する防御能を付与する)

## 論文内容の要旨

[はじめに]

*Mycobacterium tuberculosis* (Tb) や *Listeria monocytogenes* (LM) といった細胞内寄生菌に対する防御には抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導が重要である。腫瘍免疫などにおいては、強力な抗原提示能を持つ樹状細胞 (DC) を用いて CTL を誘導する細胞ワクチンが報告されているが、呼吸器感染症に対する CTL 指向性の DC ワクチンについてはほとんど研究されていない。また、生体は気道や消化管などの広大な粘膜面を介して外界と接し、この粘膜面は絶えず侵入してくる外来性の病原体や抗原に対し第一線のバリアとしての役割を担っている。最近、これらの粘膜面に、全身性の免疫機構とは全く異なる独自の免疫機構が発達していることが明らかにされた。このユニークな免疫機構は **common mucosal immune system (CMIS)** と称され、粘膜面に存在する誘導組織内で DC などの抗原提示細胞などによって活性化された T 細胞や B 細胞が、一度粘膜面を離れ大循環に入って全身を巡り、再び実効組織である粘膜面に **homing** し、**effector** 細胞としての機能を発揮する。これは広大な粘膜面に効率良く **effector** 細胞を分布させる精緻な仕組みを構成している。近年、次世代のワクチンとしてこの CMIS を利用して粘膜面に広く免疫を誘導するワクチン—粘膜ワクチン—の研究が主として腸管で始まっている。肺においても、経気道的にワクチンを投与することによって肺局所に防御免疫を誘導し、病原体をその侵入門戸で効率的に撃退できる可能性がある。しかし、結核菌などの細胞内寄生菌による肺感染症に対する肺の粘膜ワクチンについてはまだほとんど研究が進んでいない。

そこで、本研究では、細胞内寄生菌の肺感染症に対して、効率良く防御免疫を誘導する「DC を用いた CTL 誘導性の粘膜細胞ワクチン」の開発を試みた。

[材料ならびに方法]

1. 7-10 週齢の GFP マウス大腿骨及び脛骨骨髓から IL-4 及び GM-CSF を用いて誘導した DC を、lipopolysaccharide (LPS) で 16 時間刺激した後に気管内投与し、縦隔リンパ節 (MLN) への移動を LPS 刺激の有無で比較した。さらに DC を LPS 曝露前、曝露後 6 時間、12 時間、18 時間でそれぞれ回収し、リアルタイム PCR を用いて、DC の末梢組織への移動に関わる CCR5、6 及びリンパ節への移動に関わる CCR7 の mRNA 発現量を評価した。
2. 7-10 週齢の BALB/c マウス由来の DC を、LPS で 16 時間刺激した後に LM の immunodominant CTL epitope である listeriolysin O (LLO) 91-99 ペプチドを添加し、経気管的に BALB/c マウスに投与した。2 週間後に縦隔リンパ節 (MLN) 及び脾臓細胞を回収し、tetrameric H2-K<sup>d</sup>/LLO 91-99 peptide complex を用いて LLO 91-99 特異的な CTL を評価し、LLO 91-99 特異的なサイトカイン (IL-4、5、10、13、IFN- $\gamma$ ) 産生能及び J774 細胞を用いた LLO 91-99 特異的 CTL 活性を検討した。さらに LM  $2.5 \times 10^4$  CFU を経気管投与し、投与 72 時間後の肺・脾臓・肝臓の菌量及び生存率を評価した。

[結果]

1. LPS で 16 時間刺激した DC (LPS-GFP DC) は、LPS で刺激しない DC (GFP DC) よりも MLN に効

率的に移動した。また、CCR7 は LPS 刺激後 6 時間をピークとする mRNA 発現の増加が見られ、CCR5 及び 6 は時間と共に発現が低下する傾向が見られた。

2. LLO 91-99 特異的 CTL は、MLN と脾臓の両方で LPS 刺激し LLO91-99 をパルスした DC を投与した群 (LPS-LLO DC 群) で誘導されており、LPS で刺激せず LLO 91-99 をパルスした DC を投与した群 (LPS-control DC) と比べて有意に多く認められた。また、LPS 刺激し、LLO 91-99 をパルスしない DC 及び LPS 刺激せず、LLO 91-99 をパルスしない DC を投与した群 (LPS-control DC 群と control DC 群) では CTL は誘導されなかった。サイトカイン産生能では、LPS-LLO DC 群で LLO-DC 群に比べて有意な IFN- $\gamma$  の増加が MLN と脾臓の両方で認められた。IL-4, 5, 10, 13 などの Th2 系サイトカインは MLN では産生が増加していたが、脾臓ではそのような傾向はなかった。CTL 活性の評価では、LPS-LLO DC 群では MLN 及び脾臓の両方で LLO 91-99 特異的 CTL 活性の亢進が認められたが、他群 (LPS-control DC, LLO DC, control DC) では有意な活性は見られなかった。感染実験では、LPS-LLO DC 群では肺、脾臓、肝臓のいずれにおいても他群に比べて臓器あたりの菌量が 1/10 ~ 1/100 程度に低下していた。また、LLO DC, LPS-control DC, control DC 群は気道感染後 7 日以内の全てのマウスが死亡したが、LPS-LLO DC 群では 80% のマウスが生存した。

#### [考察]

LPS で刺激し成熟させた DC に、LM の immunodominant CTL epitope である LLO 91-99 をパルスし、経気道的に接種することによって (LPS-LLO DC 群)、LLO 91-99 特異的な Th1 サイトカイン産生能と細胞障害活性を持つ CTL が MLN のみならず、脾臓にも誘導された。さらに、感染実験においては、臓器内菌量の著明な減少と、生存率の上昇が見られた。これらの感染防御免疫の誘導は、DC を LPS で刺激せず、LLO 91-99 をパルスしたのみの DC を投与した群 (LLO DC 群) ではほとんど認められなかった。この原因として、リンパ節に DC が移動する際に主要な役割を果たす chemokine receptor である CCR7 の発現が、LPS 刺激によって誘導されることが重要と考えられた。さらに、LPS 刺激によって、B7-1、B7-2 などの副刺激分子の発現増強や、IL-12 などの Th1 誘導性のサイトカインの産生増加などがおこり、DC の抗原提示能が増強することも関与している可能性が推察される。

#### [結論]

今回の研究によって、LPS 刺激後、immunodominant CTL epitope をパルスした DC を経気管投与することで、MLN 及び全身に特異的な CTL を誘導し、その結果 LM の呼吸器感染に対して強力な感染防御能が付与されることを証明した。したがって、我々の開発した DC を用いた粘膜ワクチンは、結核菌を含む細胞内寄生菌による肺感染症に対するワクチン開発において、有用な新しい戦略の一つになりうる可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

様々な感染症が世界的な広がりをみせているなか、感染症予防における有効なワクチン開発には多くの関心がよせられている。経皮的あるいは経鼻、経気道、経腸など経粘膜的に投与されたワクチンを取り込んだ樹状細胞 (dendritic cell: DC) は有害な病原体や抗原を排除する細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T cell: CTL) を分化させることにより、微生物感染防御に重要な役割を果たす。したがって、投与されたワクチンがいかに効率良く DC に処理されるかがワクチンの有効性を担保する。DC の免疫機能が解明される

につれ、近年ワクチンを *in vitro* で取り込んだ DC を生体に投与して強力な CTL を誘導する DC ワクチン法が開発されつつある。

*Listeria monocytogenes* (リステリア) は代表的な細胞内寄生菌であり、人畜共通の感染源となる。健常人に対する病原性は弱い、免疫力の低下した個体、老人、乳児などではときに髄膜炎、敗血症など重篤な症状を引き起こす。また、妊婦では流産の原因となることもある。マウスではリステリア感染モデルが確立されており、CTL 誘導エピトープである Listeriolysin O (LLO) 91-99 には強い感染防御効果がある。

申請者は、リステリア感染症のマウスモデルを用いて、経気道的に DC ワクチンを投与し感染防御を誘導する粘膜ワクチン法の開発を試みた。

用いられた動物、材料ならびに方法は適切であった。DC としては、IL-4 及び GM-CSF 存在下で骨髓細胞から得られた 未熟 DC を LPS 刺激により成熟 DC として用いた。特記すべき点は、オワンクラゲ緑色発光タンパク(GFP)BALB/c マウスを用いたことで、経気道投与後のリステリア抗原ペプチド LLO91-99 でパルスした成熟 DC のリンパ節内分布が明らかとなった。また、DC 遊走のマーカーとして CCR5、CCR6、CCR7 の発現を検討した。CTL アッセイはテトラマー法、サイトカイン産生、*in vitro* LDH 遊離試験で行った。コントロールとして、LLO91-99 でパルスしていない DC を用いた。

得られた結果は以下の通りである。

1. LPS 刺激成熟 DC は経気道投与後、縦隔リンパ節に遊走し、同時にリンパ節への遊走に関わっている CCR7 発現が増強し、肺への局在に関与する CCR5、CCR6 発現は低下していた。
2. LLO91-99 パルス DC ワクチン投与後、縦隔リンパ節、脾に LLO91-99 特異的 CTL 誘導が見られた。
3. 縦隔リンパ節、脾では、インターフェロン(IFN)- $\gamma$  産生、*in vitro* LDH 遊離試験で検討した CTL 活性は高く、縦隔リンパ節では Th2 サイトカイン産生も見られた。リステリア菌感染実験では、LLO91-99 パルス DC ワクチン群ではコントロール群と比べ、臓器内菌量が有意に低く、マウス生存率は有意に高かった。

これらの結果から、経気道的に投与された LLO91-99 パルス DC は気道粘膜から生体内に侵入し、LLO91-99 特異的 CTL を誘導することによりリステリアに対するワクチン効果を示した。従来の研究で感染症予防はワクチンのタイプ、投与経路に左右されることが知られているが、本研究は *in vitro* で作成された DC を用いることにより極めて効率良く感染防御が得られることが明らかとなり、新しい感染症ワクチン開発の可能性を示唆した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) common mucosal immune system (CMIS)について
- 2) リステリア感染様式と感染防御について
- 3) 内因性抗原と外因性抗原について
- 4) 呼吸器感染症とワクチン素材の多様性について
- 5) 未成熟 DC と成熟 DC の免疫能の違いについて
- 6) DC ワクチンの安全性について
- 7) GFP マウスとワイルドタイプマウスとの免疫能の違いについて
- 8) DC ワクチンが縦隔リンパ節で Th1 及び Th2 を誘導するメカニズムについて
- 9) LLO91-99 以外のエピトープを用いた場合の感染防御について

## 10) マクロファージを用いた場合の感染防御能について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	瀧川 雅浩	
	副査	前川 真人	小川 法良